

BEST AVAILABLE COPY

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 676 451

(21) N° d'enregistrement national :

91 06068

(51) Int Cl⁵ : C 08 F 12/08, 6/14; C 07 K 17/08

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 15.05.91.

(71) Demandeur(s) : Société Anonyme dite: BIO
MERIEUX — FR.

(30) Priorité :

(72) Inventeur(s) : Delair Thierry François.

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : 20.11.92 Bulletin 92/47.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche : Se reporter à la fin du présent fascicule.

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire : Cabinet Germain et Maureau.

(54) Procédé pour préparer un latex à groupements fonctionnels de surface et latex obtenu.

(57) L'invention concerne un procédé pour préparer une émulsion aqueuse d'un copolymère présentant des groupements fonctionnels en surface consistant à effectuer une copolymérisation entre au moins un monomère de type vinylique ou styrénique et un monomère portant au moins un groupement précurseur cationique, en présence d'un amorceur, à hydrolyser en milieu neutre ou basique, les groupements précurseurs cationiques pour libérer les groupements fonctionnels, entre les étapes de copolymérisation et d'hydrolyse ou au plus tard pendant l'hydrolyse, une addition d'au moins un agent tensioactif étant effectuée pour obtenir après hydrolyse un copolymère sous forme de latex stabilisé.

L'invention a également pour objet une dispersion d'un copolymère cationique intermédiaire portant en surface des groupements précurseurs de groupements fonctionnels, ainsi qu'une dispersion du copolymère final comportant en surface des groupements fonctionnels.

FR 2 676 451 - A1



PROCEDE POUR PREPARER UN LATEX A GROUPEMENTS FONCTIONNELS DE SURFACE ET LATEX OBTENU

L'invention concerne un procédé pour préparer un latex copolymérique, présentant des groupements fonctionnels en surface, sous une forme 5 stabilisée. Elle concerne également les latex obtenus par ce procédé et leur utilisation pour immobiliser des composés biologiquement actifs.

Par latex, au sens de la présente invention, il faut entendre une émulsion d'un polymère ou copolymère naturel ou synthétique, notamment élastomère, dans un milieu aqueux, constituant un système colloïdal.

10 Par groupement fonctionnel de surface selon l'invention, on entend un groupement réactif, du type thiol, amine, imido-ester, ou amidine, accessible et susceptible d'interagir par des liaisons physiques et/ou chimiques avec un composé biologiquement actif, à l'interface entre l'élastomère et le milieu comprenant ledit composé.

15 Par composé biologiquement actif, au sens de la présente invention, on entend toute matière, produit ou molécule présentant une utilité, ou fonction technique ou résultat, dans un processus, procédé ou méthode, de nature biochimique, biologique, thérapeuthique, pharmacologique, etc...

Ressortent notamment de cette définition :

20 - les principes actifs médicamenteux,
- du matériel biologique tels que des enzymes, anticorps, antigènes, fragments d'ADN ou ARN,
- des produits cosmétiques nutritifs,
- des produits phytosanitaires.

25 Les procédés actuellement utilisés pour préparer un polymère synthétique à groupements fonctionnels de surface consistent à effectuer une copolymérisation, en présence d'un amorceur, entre au moins un monomère de type vinylique et/ou styrénique et un monomère présentant des groupements dits précurseurs, c'est-à-dire des groupements qui, dans un milieu approprié, libèrent des groupements fonctionnels réactifs.

30 Les composés biologiquement actifs sont ensuite immobilisés sur le copolymère par l'intermédiaire de ses groupements fonctionnels en surface ou après activation de ces derniers.

35 L'invention concerne plus particulièrement un procédé pour préparer un copolymère, dont une étape intermédiaire consiste à obtenir un copolymère à groupements précurseurs cationiques.

Les travaux de K.YAMAGUCHI et coll. qui font l'objet de la

publication Makromol. Chem., Rapid Commun.10, 397 (1989) concernent la préparation de copolymères portant en surface des groupements thiol S-H, qui trouvent notamment une application dans l'immobilisation d'enzymes.

Le procédé de synthèse décrit est en deux étapes, selon lesquelles on effectue une copolymérisation en émulsion du styrène avec le chlorure d'isothiouronium en présence d'un agent amorceur cationique ou anionique, puis on hydrolyse en milieu basique les groupements précurseurs du copolymère cationique obtenu, pour libérer les groupements thiol fonctionnels. Cependant, le procédé de préparation de copolymères à groupements fonctionnels de surface, en présence d'un agent amorceur anionique conduit à de faibles rendements et est peu reproductible, de sorte que l'application industrielle de ce procédé présente peu d'intérêt.

Le copolymère final obtenu par ce procédé en présence d'un amorceur cationique présente une teneur en groupements thiol faible et très inférieure à la teneur en sulfure du copolymère cationique portant les groupements précurseurs, c'est-à-dire avant hydrolyse.

Ce résultat déterminé expérimentalement par titration est la conséquence de deux inconvénients, essentiellement :

- le milieu d'hydrolyse crée une déstabilisation du latex entraînant une agrégation des particules de copolymères dont les groupements thiol deviennent inaccessibles, notamment au réactif de titration

- le milieu d'hydrolyse accède difficilement aux groupements isothiouronium à l'intérieur du latex, et ces derniers sont peu ou non hydrolysés.

La présente invention apporte une solution en proposant un procédé pour préparer une émulsion aqueuse d'un copolymère à groupements fonctionnels en surface, conduisant à un latex stabilisé dans lequel les groupements fonctionnels sont obtenus avec un rendement élevé et sont directement accessibles, notamment par des composés biologiquement actifs.

Le procédé selon l'invention consiste :

- à effectuer une copolymérisation entre au moins un monomère de type vinylique ou styrénique et un monomère portant au moins un groupement précurseur cationique d'un groupement fonctionnel de surface, en présence d'un amorceur cationique ou non ionique,

- à hydrolyser en milieu neutre ou basique, les groupements précurseurs cationiques pour libérer les groupements fonctionnels, et entre les étapes de copolymérisation et d'hydrolyse ou au plus tard pendant l'étape

d'hydrolyse, une addition d'eau moins un agent tensioactif est effectuée pour obtenir après hydrolyse un copolymère sous forme de latex stabilisé.

5 De façon surprenante, on observe que l'accessibilité aux groupements fonctionnels par des composés biologiquement actifs n'est pas gênée par la présence de l'agent tensioactif en surface du latex.

Selon l'invention, l'agent tensioactif est non ionique ou cationique. On peut également utiliser un mélange d'agents tensioactifs non ioniques et/ou cationiques.

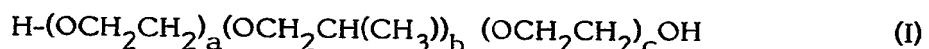
10 L'agent tensioactif non ionique est préférentiellement choisi :

- parmi les agents tensioactifs comportant une fonction ester tels que les esters de glycol et d'acide gras, les esters de glycérol et d'acide gras, les esters de polyglycérol et d'acide gras, les esters de polyéthyléneglycol et d'acide gras, les esters de saccharose et d'acides gras, tels que ceux disponibles dans le commerce sous les marques SPAN et MONTANE, les 15 esters de saccharose et de triglycérides, les esters de sorbitanne et d'acides gras et les esters de sorbitanne polyoxyéthyléné, tels que ceux commercialisés sous les marques TWEEN et MONTANOX ;

20 - parmi les agents tensioactifs comportant une fonction éther, tels que les éthers de polyoxyéthyléneglycol et d'alkylphénol, tels que ceux commercialisés sous les marques TRITON, IGEPAL, SURFONIL et NONIDET, et les éthers de polyoxyéthyléneglycol et d'alcool gras, tels que ceux connus sous les marques BRIJ, LUBROL et AL ;

25 - parmi les agents tensioactifs à fonction amide ;
- parmi les sucres glycosylés tels que les alkylglycosides et les alkylthioglycosides ;

- parmi les agents tensioactifs de formule générale (I) :



30 dans laquelle a, b, c, représentent des nombres entiers et a et c statistiquement sont des nombres entiers identiques.

Selon une mise en œuvre préférentielle du procédé, l'agent tensioactif est un ester de sorbitanne polyoxyéthyléné et en particulier le monolaurate de polyoxyéthylène sorbitanne, commercialisé sous la marque TWEEN 20.

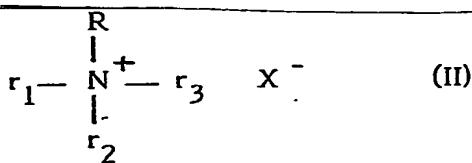
35 Selon une autre mise en œuvre avantageuse du procédé, l'agent tensioactif est le t. octylphénoxypolyéthoxyéthanol commercialisé sous la marque TRITON X-405 ou l'octylphénolpolyéthylèneoxyde commercialisé

sous la marque NONIDET P 40.

L'agent tensioactif cationique est préférentiellement choisi :

- parmi les dérivés à azote aliphatique, tels que les sels d'ammonium quaternaire de formule générale (II)

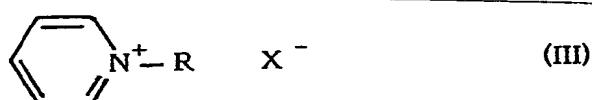
5



10 dans laquelle r_1 , r_2 , et r_3 chacun indépendamment représente des radicaux alkyles à chaîne courte tels que C_1 , C_2 , C_3 ; R représente un radical alkyle à longue chaîne linéaire ou ramifiée, de préférence de C_6 à C_{25} , un aryle substitué ou non substitué, tel que phényle, benzyle ou un hétérocycle ; X représente un halogène tel que iodé, brome, fluor ou chlore, un groupement sulfonyle tel que éthyl et aryl sulfonyles ; parmi ces dérivés, on choisira préférentiellement l'iodure de n-octyltriméthylammonium, le bromure de n-décyltriméthylammonium, le bromure de n-dodécyltriméthylammonium et le bromure de n-hexadécyltriméthylammonium ;

15 - parmi les dérivés à azote hétérocyclique, notamment

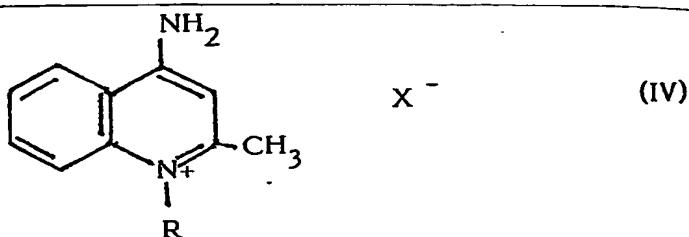
20 . les sels d'alkylpyridinium, de formule générale (III)



25 dans laquelle R représente un radical alkyle à longue chaîne linéaire ou ramifiée, de préférence de C_6 à C_{25} , un aryle substitué ou non substitué, tel que phényle, benzyle ou un hétérocycle ; X représente un halogène tel que iodé, brome, fluor ou chlore, un groupement sulfonyle tel que éthyl- et aryl-sulfonyles

30 - parmi les sels d'alkylquinolinium, de formule générale (IV)

35



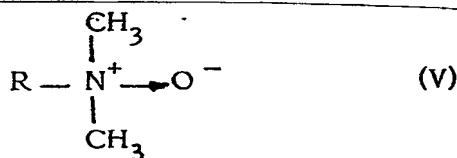
dans laquelle R représente un radical alkyle à longue chaîne linéaire ou

ramifiée, de préférence de C₆ à C₂₅, un aryle substitué ou non substitué, tel que phényle, benzyle ou un hétérocycle ; X représente un halogène tel que iodé, brome, fluor ou chlore, un groupement sulfonyle tel que éthyl- et aryl-sulfonyles

5

- parmi les oxydes d'amines, de formule générale (V) :

10



15

dans laquelle R représente un radical alkyle à longue chaîne linéaire ou

ramifiée, de préférence de C₆ à C₂₅, un aryle substitué ou non substitué, tel

que phényle, benzyle ou un hétérocycle ; X représente un halogène tel que

iodé, brome, fluor ou chlore, un groupement sulfonyle tel que éthyl- et aryl-sulfonyles.

20

Selon l'invention on peut additionner plusieurs agents tensioactifs pour stabiliser le latex et notamment un mélange de tensioactifs cationiques, un mélange de tensioactifs non ioniques ou un mélange de tensioactifs cationiques et non ioniques.

La quantité d'agent tensioactif additionnée pour un litre de copolymère représentée par QT, est définie par l'équation

25

$$QT = \frac{SL}{Tr \cdot 100 \cdot Ao}$$

dans laquelle :

30

- QT est le nombre de molécules de l'agent tensioactif
- Ao est l'aire spécifique occupée en Å²/molécule
- SL est la surface développée par un litre de copolymère, exprimée en m², et définie par l'équation suivante :

6P

$$SL = \frac{6P}{D\rho}$$

35

avec ∴ P égal au poids du copolymère dans un litre de suspension, en m²

- D égal au diamètre de la particule de copolymère, en µm
- ρ égal à la masse volumique du copolymère, en g/l.

La quantité d'agent tensioactif est donc une fonction de la taille des

particules du copolymère, de la nature du monomère portant les groupements précurseurs, du taux de solide du latex, de la nature de l'agent tensioactif et de la force ionique du milieu.

5 La quantité préférentielle d'agent tensioactif à additionner est comprise dans l'intervalle des valeurs de QT, pour lesquelles Tr est au moins de 15 %, de préférence compris entre 25 et 500 % et notamment entre 25 et 75 %.

10 Un autre objet de la présente invention est une dispersion d'un copolymère cationique intermédiaire présentant en surface des groupements précurseurs de groupements fonctionnels, comprenant un agent tensioactif non ionique ou cationique, ce dernier étant préférentiellement choisi parmi les agents tensioactifs cités ci-dessus. La quantité d'agent(s) tensioactif(s) utilisée pour un litre de copolymère est représentée par QT ayant la même 15 définition que précédemment.

Par une hydrolyse en milieu neutre ou basique, les groupements précurseurs de ce produit intermédiaire pourront être hydrolysés, libérant les groupements fonctionnels recherchés.

20 L'invention vise également une dispersion en milieu neutre ou basique, d'un copolymère final présentant en surface, des groupements fonctionnels libres, comprenant un agent tensioactif non ionique ou cationique, de préférence choisi parmi les agents tensioactifs mentionnés ci-dessus. La quantité d'agent(s) tensioactif(s) utilisée pour un litre de copolymère est 25 représentée par QT ayant la même définition que précédemment.

La présente invention vise aussi une dispersion en milieu neutre ou basique d'un copolymère final, c'est-à-dire portant des groupements fonctionnels en surface, supportant ou attachant un composé biologiquement 30 actif couplé aux groupements fonctionnels du copolymère. Ce dernier peut intervenir dans un processus immunologique et être notamment un fragment d'anticorps.

35 L'invention est à présent décrite plus en détail par les exemples suivants, donnés à titre d'illustration mais qui ne sont en aucun cas limitatifs, et en référence au dessin annexé dans lequel :

Figure 1 est une représentation de l'intensité colorimétrique (D.O) développée par la réaction entre un latex référencé ci-après SC14 et le

réactif d'Ellman, en fonction du temps, la courbe a) correspondant au latex SC14 stabilisé par un agent tensioactif non ionique et la courbe b) correspondant au latex SC14 stabilisé par un agent tensioactif cationique.

5 Figure 2 est une représentation du rendement de la réaction de couplage selon la méthode d'Ellman en fonction du temps, à partir du latex SC14 stabilisé par un agent tensioactif non ionique à savoir TRITON selon courbe a), NONIDET P40 selon courbe b) et TWEEN selon courbe c).

10 Figure 3 est une représentation du rendement du couplage de fragments d'anticorps sur le latex SC14 en fonction de la concentration en fragments.

10

EXEMPLE 1 :

Préparation de latex contenant des groupements fonctionnels de surface

a) Protocole général

15

On introduit dans un réacteur muni d'une double enveloppe chauffante, d'un réfrigérant, d'un agitateur mécanique et d'une sonde de température, un mélange composé d'eau, de monomère portant des groupements précurseurs, de styrène et éventuellement de sulfate de magnésium heptahydraté, dans 20 des quantités appropriées, et on laisse le mélange sous agitation jusqu'à ce que la température se stabilise à environ 70°C. On introduit alors dans le réacteur une quantité déterminée d'un amorceur cationique qui entraîne le début de la polymérisation et la réaction se poursuit jusqu'à consommation complète du styrène. La cinétique de polymérisation est suivie par 25 prélèvements successifs au cours du temps.

b) Préparation de latex intermédiaire contenant des groupements précurseurs de fonction thiol

30 On dissout dans 175 g d'eau, 0,5 g de monomère portant des groupements précurseurs, à savoir le chlorure de vinylbenzylisothiouronium et on ajoute au mélange obtenu 40 g de styrène (Janssen Chimica, France). Le mélange est introduit dans un réacteur du type décrit ci-dessus et soumis à une agitation à 350 tours par minute jusqu'à ce que la température atteigne 70°C. Une fois 35 la température stabilisée à 70°C, on ajoute une solution de 0,14 g de dihydrochlorure de 2,2'-azobis-(2-amidino-propane) comme amorceur dans 5 ml d'eau. Après deux heures de polymérisation, on obtient des particules

de 66,4 nm. La conversion est de 100 % et le taux de solide du latex est d'environ 20 %.

5 On répète le protocole tel que décrit ci-dessus en diminuant de moitié la quantité de monomère portant des groupements précurseurs et en ajoutant de 0,1 g à 0,7 g de sulfate de magnésium heptahydraté. En fin de polymérisation, on obtient des particules dont le diamètre augmente avec la force ionique, de 100 nm à 274 nm, et un latex présentant un taux de solide d'environ 20 %.

10

c) Préparation de latex intermédiaires contenant des groupements précurseurs de fonction amine

15 On dissout dans 175 g d'eau, 0,37 g de monomère portant des groupements précurseurs, à savoir l'hydrochlorure de l'aminométhyl-styrène et 0,02 g de sulfate de magnésium heptahydraté. Le mélange est introduit dans un réacteur et soumis à agitation à 350 tours par minute, jusqu'à ce que la température se soit stabilisée à 70°C. On introduit ensuite 40 g de styrène 20 (Janssen Chimica, France) et l'on attend que la température du mélange se stabilise à 70°C. On introduit alors 0,14 g d'amorceur dissous dans 5 ml d'eau pour le déclenchement de la réaction de polymérisation. En fin de polymérisation, on obtient des particules de 265 nm et le latex présente un taux de solide d'environ 20 %.

25

EXEMPLE 2 :

Obtention de latex finaux stabilisés, après addition d'agents tensioactifs et hydrolyse

30

Des latex préparés par copolymérisation du styrène et d'un monomère portant des groupements précurseurs, selon le procédé décrit en Exemple 1 ont été ramenés par concentration à un pourcentage en solide de 0,1 à 20 %. A ces suspensions de latex ont été ajoutées diverses quantités d'agents tensioactifs en fonction de la taille des particules, de la nature du monomère portant des groupements précurseurs, du taux de solide permettant d'obtenir un taux de recouvrement assurant la stabilité du latex final. L'agent 35

5 tensioactif utilisé est un tensioactif non ionique, à savoir le t-octylphénoxypolyéthoxyéthanol commercialisé sous la marque TRITON X-405 (TX405), sous forme d'une solution aqueuse à 70 % de la société Sigma Chimica Company. Les solutions ont été soumises à agitation pendant quatre heures à température ambiante. Les résultats sont présentés dans les tableaux ci-après :

10	Latex (1)	$\frac{M}{S}$ (%) (2)	Fonction	Taille des particules (nm)	Taux de solide (m ²)	SL (m ²) (3)	SO (m ²) (4)	Tensioactif (g. l ⁻¹)	T (%)
15	SC1	5,50	thiol	57	10	10526	4214	10	40
	SC14	1,46	thiol	256	10	2344	842	2	36
	SC15	1,46	thiol	262	10	2290	842	2	37
	SC35	1,50	thiol	700	5	429	842	2	200
	NC3	0,92	amine	265	10	2264	1684	4	74
	NC5	1,50	amine	424	5	708	2107	5	300

20

(1) SC1, SC14, SC15 et SC35 résultant de la copolymérisation du styrène avec un monomère portant des groupements précurseurs de fonctions thiol NC3 et NC5 résultent de la copolymérisation du styrène avec un monomère portant des groupements précurseurs de fonctions aminées

25 (2) M est la concentration du monomère à groupements précurseurs (g/l)
S est la concentration du styrène (g/l)

(3) SL et Tr ont les mêmes définitions que précédemment

(4) SO est égal à la surface occupée par l'agent tensioactif (m²)

30 De la même manière, on a stabilisé le latex SC14 dilué jusqu'à 10 % en solide :

- d'une part, avec 4 g/l d'un agent tensioactif cationique, à savoir le bromure d'hexadécytriméthylammonium (Fluka Chemica AG)
- d'autre part, avec un agent tensioactif non ionique : trois

35 tensioactifs non ioniques différents respectivement le t-octylphénoxy-polyéthoxyéthanol (TRITON-405), l'octylphénolpolyéthylèneoxyde (NONIDET P40 de la société BDH Chemicals Ltd) et le monolaurate de polyoxyéthylène

sorbitanne (TWEEN 20 de la société Biorad), ont été expérimentés.

EXEMPLE 3 :

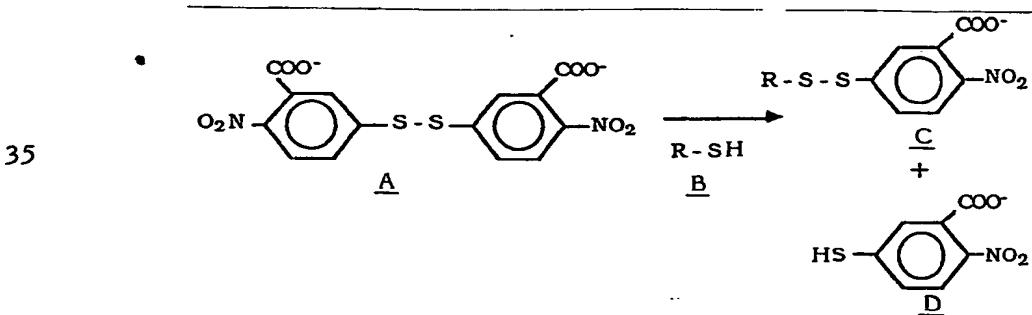
5 **Mise en évidence de la restauration des groupements fonctionnels de surface après hydrolyse des groupements précurseurs**

a) Groupement thiol

10 Pour montrer la restauration des groupements thiol après hydrolyse, on utilise la méthode d'Ellman, telle que décrite ci-après, appliquée au latex SC14 préparé selon Exemple 1.

15 A 4,5 ml d'un tampon à 50 mM, ont été ajoutés 0,5 ml du latex SC14 stabilisé par un agent tensioactif non ionique selon Exemple 2 et 0,1 ml d'une solution à 4 mg/ml d'acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque (réactif d'Ellman). Pour déterminer les cinétiques de la réaction, 0,8 ml de parties aliquotes ont été prélevées et centrifugées à 16.000 g dans une centrifugeuse d'Eppendorff 5415. La densité optique (D.O) du surnageant a été mesurée à 20 412 nm par rapport à un blanc, qui est une dilution de 0,1 ml du réactif d'Ellman dans 5 ml de tampon. Le rendement de la réaction de couplage entre le groupement thiol et une molécule d'acide 5-thiol-2-nitrobenzoïque est le rapport entre la D.O d'un mélange de 0,1 ml de mercaptoéthanol et de 0,1 ml de réactif d'Ellman dans 4,9 ml de tampon.

25 Cette méthode va permettre de montrer la disponibilité des groupements thiol et de mettre en évidence l'importance du type d'agent tensioactif utilisé pour la stabilisation. Dans cette méthode, on utilise la capacité du réactif d'Ellman à réagir avec les groupements sulfhydryles de surface du latex pour donner un composé disulfure et un composé coloré comme représenté dans le schéma réactionnel ci-dessous :



dans lequel A représente le réactif d'Ellman, B correspond au latex, C est le composé disulfure formé et D est le composé coloré.

5 Lorsque la réaction se poursuit, la coloration jaune du surnageant s'intensifie et on peut mesurer la D.O du surnageant sur un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 412 nm. Comme cela ressort du schéma réactionnel ci-dessus, l'intensité de couleur développée est proportionnelle au composé disulfure formé et en conséquence aux groupements thiol libres à la surface du latex.

10 La même technique a été utilisée pour tester le latex SC14 stabilisé par un agent tensioactif cationique, le bromure d'hexadécytriméthylammonium.

15 Pour chacun des deux latex stabilisés l'un par l'agent tensioactif non ionique, l'autre par un agent tensioactif cationique, l'évolution de l'intensité colorimétrique développée en fonction du temps a été étudiée.

20 Ainsi, selon Figure 1, la courbe a) représente l'intensité colorimétrique développée en fonction du temps pour un latex SC14 stabilisé par du Triton X-450 non ionique. Cette courbe confirme donc la restauration des groupements thiols de surface du latex après hydrolyse. La courbe b) correspond à la même représentation pour un latex SC14 stabilisé par le bromure d'hexadécytriméthylammonium (cationique).

25 25 La comparaison entre les courbes a) et b) de Fig. 1 fait apparaître que dans le cas d'une stabilisation avec un tensioactif cationique, en l'occurrence le bromure d'hexadécytriméthylammonium, le signal est inférieur à celui obtenu avec un tensioactif non ionique tel que le Triton. Ceci signifie que les tensioactifs non ioniques sont des stabilisants neutres vis-à-vis de la réaction de couplage, tandis que les tensioactifs cationiques semblent être inhibiteurs de cette réaction.

30 Selon Fig. 2, sont reportés les résultats d'une étude sur le comportement de différents tensioactifs appartenant au même groupe d'agents tensioactifs non ioniques, sur la stabilisation du latex SC14 : la courbe a) correspond au TRITON, la courbe b) au NONIDET P40 et la courbe c) au TWEEN. Cette figure met en évidence un meilleur rendement de couplage à partir du latex

SC14 stabilisé par TRITON, qui permettrait une obtention rapide et avec un rendement élevé des groupements fonctionnels.

5 b) Groupements amine

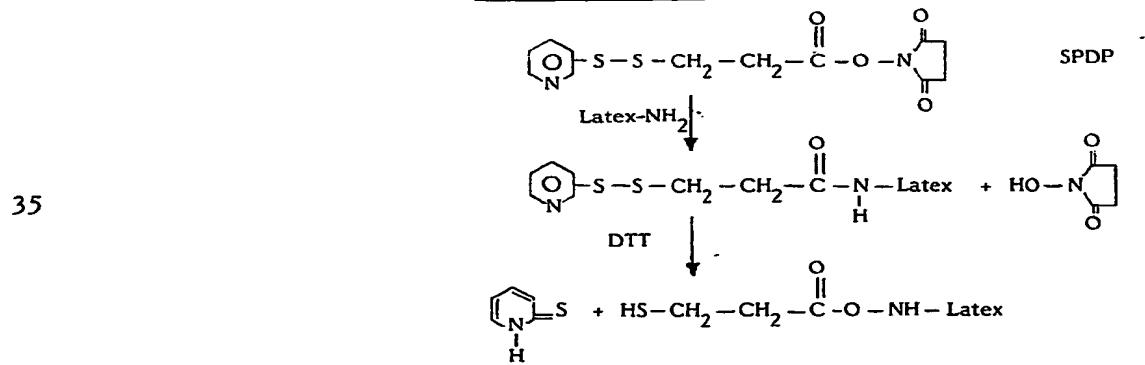
On a mis en évidence la disponibilité des fonctions amines après stabilisation de latex aminés avec du Triton X 405, selon le protocole décrit ci-dessous, qui est une adaptation au latex de la méthode décrite par T.T. Ngo (Journal of Biochemical and Biophysical Methods 12,349) (1986).

A 0,5 ml de latex à 5 %, on ajoute 0,5 ml de tampon carbonate (pH 8,2, 0,1 mM), 10 µl d'une solution 0,5 M de N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate (SPDP) dans du dioxane et 1 grain de 15 4-diméthylaminopyridine (DMAP). On agite 100 minutes à température ambiante, puis on centrifuge le latex et on récupère le surnageant. Les latex sont resuspendus dans 1 ml de tampon carbonate (pH 8,2, 0,05 mM) et centrifugés de nouveau. Le surnageant est conservé et on reprend le culot comme précédemment. On ajoute à chaque surnageant et à la suspension de 20 latex 0,1 ml d'une solution de dithiothreitol (DTT) (0,5 mM). On agite 30 minutes à température ambiante, on centrifuge les latex et on récupère les surnageants. Les trois surnageants de chaque latex sont dilués au 1/20ème dans un tampon carbonate (pH 8,2, 0,1 mM) et on lit la densité optique à 343 nm contre un blanc contenant la même quantité de DTT.

25

Le même traitement est réalisé avec du SPDP hydrolysé au préalable par 10 µl d'éthanolamine pour évaluer la valeur de l'adsorption éventuelle du réactif par le latex.

30 Le schéma de la réaction est décrit ci-dessous :



La pyridine-2-thione est un indicateur qui absorbe la lumière de longueur d'onde égale à 343 nm.

5 Les résultats pour les latex précédemment décrits NC5 et NC3 sont respectivement 70 $\mu\text{eq/g}$ de latex sec et 40 $\mu\text{eq/g}$ de latex sec. Ceci représente dans chacun de ces cas, environ 70 % de disponibilité par rapport aux quantités introduites au cours de la synthèse du latex.

10 c) Hypothèse sur le rôle stabilisateur de l'agent tensioactif dans les latex

15 Les tensioactifs non ioniques ou cationiques présentent une partie hydrophobe et une partie hydrophile. Les tensioactifs par leur partie hydrophobe s'adsorbent sur la surface du copolymère par interaction hydrophobe.

20 Lorsqu'on utilise des tensioactifs non ioniques, la stabilisation des particules de copolymères serait due à un phénomène d'encombrement stérique. En d'autres termes, lorsque les molécules de tensioactifs non ioniques sont adsorbées à la surface des particules du copolymère par leur partie hydrophobe, leur queue hydrophile occupe un certain espace du milieu aqueux, empêchant toute approche d'autres particules de copolymère stabilisées. On empêche ainsi l'agrégation des particules de copolymères.

25 Lorsqu'on utilise des tensioactifs cationiques, leur queue hydrophile est porteuse de charges positives et l'agrégation des particules de copolymères serait empêchée par une répulsion électrostatique des charges positives entre elles.

30 EXEMPLE 4 :

Utilisation des latex stabilisés selon l'invention pour immobiliser des protéines

35 A titre d'exemple pour cette application, on utilisera des fragments Fab obtenus à partir d'anticorps polyclonaux anti-protéine C réactive (Biomérieux, France) digérés par de la pepsine à 37°C pour donner le fragment F(ab')_2 . La réduction de ces fragments avec de la mercaptoéthylamine

fournit des fragments Fab bruts. La purification a été achevée par HPLC (Kontron Instruments) après concentration.

a) Couplage de fragments d'anticorps anti-protéine C réactive

5

0,1 ml d'une suspension à 10 % en solide de latex SC14 stabilisé selon l'invention a été ajoutée à une solution de fragments d'anticorps dans un tampon Tris (pH 9,2, 50 mM) pour obtenir une solution à 1 % en solide. Les flacons ont été soumis à rotation pendant 4 heures à température ambiante. 10 Après centrifugation, les surnageants ont été enlevés et les latex ont été resuspendus dans NaCl 0,15 M BSA 10g/l (albumine de sérum de bovin), et un tampon glycine à 50 mM. La quantité de protéines restant dans les surnageants a été mesurée en utilisant le test de Bradford. La différence entre la concentration initiale et celle dans les surnageants donne la quantité 15 de fragments Fab immobilisés sur les particules de latex.

20

Les résultats d'une étude portant sur le rendement du couplage entre des fragments d'anticorps et le latex SC14 stabilisé par TRITON, en fonction de la concentration en fragments sont représentés en Fig. 3.

25

Ils montrent que sur cette gamme de concentration, la saturation du latex n'est pas atteinte.

30

Avec des latex conventionnels, lors de l'immobilisation de fragments Fab d'anticorps, soit par liaison covalente soit par adsorption passive, les latex floquent énormément. Avec les latex de l'invention, on obtient des colloïdes stables.

35

b) Activité immunologique des latex selon l'invention

L'évaluation a été faite avec un conjugué Fab-peroxydase et de l'ortophénylènediamine comme substrat. La détection de la réaction enzymatique a été faite par lecture des D.O à 492 nm. L'activité immunologique des fragments d'anticorps liés a été mesurée. La sensibilité correspond environ à une concentration de 500 µg/l d'antigènes (Protéine C-réactive). En pratique, dans les essais de diagnostic, il n'est pas nécessaire d'atteindre un niveau aussi faible pour ce paramètre.

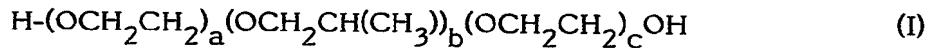
REVENDICATIONS

1/ Procédé pour préparer une émulsion aqueuse d'un copolymère présentant des groupements fonctionnels en surface consistant :

- à effectuer une copolymérisation entre au moins un monomère de type vinylique ou styrénique et un monomère portant au moins un groupement précurseur cationique, en présence d'un amorceur,
- 5 - à hydrolyser en milieu neutre ou basique, les groupements précurseurs cationiques pour libérer les groupements fonctionnels caractérisé en ce qu'entre les étapes de copolymérisation et d'hydrolyse ou au plus tard pendant l'étape d'hydrolyse, on additionne au moins un agent tensioactif pour obtenir après hydrolyse un copolymère sous forme de latex stabilisé.

10 2/ Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'agent tensioactif est non ionique et est choisi parmi :

- les agents tensioactifs comportant une fonction ester tels que les esters de glycol et d'acide gras, les esters de glycérol et d'acide gras, les esters de polyglycérol et d'acide gras, les esters de polyéthylèneglycol et d'acide gras, les esters de saccharose et d'acides gras, les esters de saccharose et de triglycérides, les esters de sorbitanne et d'acides gras et les esters de sorbitanne polyoxyéthyléné ;
- 15 20 - les agents tensioactifs comportant la fonction éther, tels que les éthers de polyoxyéthylèneglycol et d'alkylphénol et les éthers de polyoxyéthylèneglycol et d'alcool gras ;
- les agents tensioactifs à fonction amide ;
- les sucres glycosylés tels que les alkylglycosides et les alkylthioglycosides ;
- 25 - les agents tensioactifs de formule générale (I) :



30 dans laquelle a, b, c, représentent des nombres entiers et a et c statistiquement sont des nombres entiers identiques.

3/ Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'agent tensioactif est un ester de sorbitanne polyoxyéthyléné, et notamment le monolaurate de polyoxyéthylène sorbitanne.

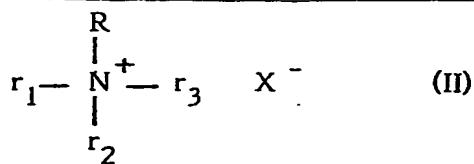
35 4/ Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'agent tensioactif est le t. octylphénoxypolyéthoxyéthanol ou l'octylphénolpolyéthylèneoxyde.

5/ Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'agent

tensioactif est cationique et est choisi parmi :

- les dérivés à azote aliphatique, tels que les sels d'ammonium quaternaire de formule générale (II)

5



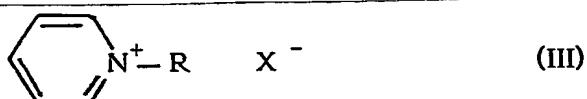
10

dans laquelle r_1 , r_2 , r_3 chacun indépendamment représente des radicaux alkyles à chaîne courte tels que C_1 , C_2 , C_3 ; R représente un radical alkyle à longue chaîne linéaire ou ramifiée, de préférence de C_6 à C_{25} , un aryle substitué ou non substitué, tel que phényle, benzyle ou un hétérocycle ; X représente un halogène tel que iodé, brome, fluor ou chlore, un groupement sulfonyle tel que éthyl et aryl sulfonyles,

15 - les dérivés à azote hétérocyclique, notamment :

• les sels d'alkylpyridinium, de formule générale (III)

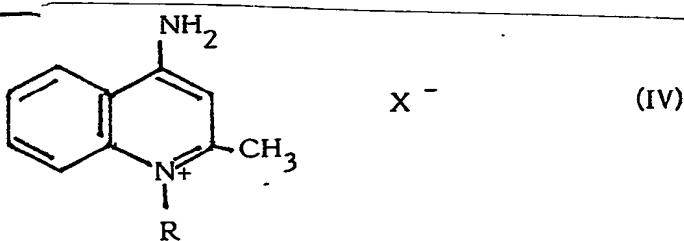
20



dans laquelle R représente un radical alkyle à longue chaîne linéaire ou ramifiée, de préférence de C_6 à C_{25} , un aryle substitué ou non substitué, tel que phényle, benzyle ou un hétérocycle ; X représente un halogène tel que iodé, brome, fluor ou chlore, un groupement sulfonyle tel que éthyl et aryl sulfonyles,

25 - les sels d'alkylquinolinium, de formule générale (IV)

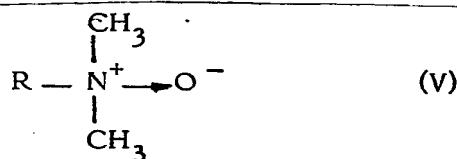
30



dans laquelle R représente un radical alkyle à longue chaîne linéaire ou ramifiée, de préférence de C_6 à C_{25} , un aryle substitué ou non substitué, tel que phényle, benzyle ou un hétérocycle ; X représente un halogène tel que iodé, brome, fluor ou chlore, un groupement sulfonyle tel que éthyl et aryl sulfonyles,

sulfonyles,

- les oxydes d'amines, de formule générale (V) :



10 dans laquelle R représente un radical alkyle à longue chaîne linéaire ou ramifiée, de préférence de C₆ à C₂₅, un aryle substitué ou non substitué, tel que phényle, benzyle ou un hétérocycle ; X représente un halogène tel que iodé, brome, fluor ou chlore, un groupement sulfonyle tel que éthyl et aryl sulfonyles.

6/ Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on additionne plusieurs agents tensioactifs cationiques et/ou non ioniques.

15 7/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la quantité d'agents tensioactifs additionnés pour un litre de copolymère est représentée par QT définie par l'équation

SL

$$QT = \frac{Tr}{100 \cdot Ao}$$

20 dans laquelle :

- QT est le nombre de molécules de l'agent tensioactif
- Tr est le taux de recouvrement du copolymère par l'agent tensioactif
- Ao est l'aire spécifique occupée par une molécule d'agent tensioactif (Å²/molécule)

25 • SL est la surface développée par un litre de copolymère (m²) le taux de recouvrement Tr est au moins de 15 %, de préférence compris entre 25 et 500 % et avantageusement entre 25 et 75 %.

30 8/ Dispersion aqueuse d'un copolymère cationique intermédiaire présentant en surface des groupements précurseurs de groupements fonctionnels, caractérisée en ce qu'elle comprend un agent tensioactif non ionique ou cationique.

9/ Dispersion selon la revendication 4, caractérisée en ce que la quantité d'agent tensioactif utilisée pour un litre de copolymère, représentée par QT, est définie par l'équation :

35 SL

$$QT = \frac{Tr}{100 \cdot Ao}$$

- QT est le nombre de molécules de l'agent tensioactif
- Tr est le taux de recouvrement du copolymère par l'agent tensioactif
- Ao est l'aire spécifique occupée par une molécule d'agent tensioactif

(\AA^2)

5 . SL est la surface développée par un litre de copolymère, (m^2) le taux de recouvrement Tr étant au moins de 15 %, de préférence compris entre 25 et 500 %, et notamment entre 25 et 75 %.

10 10/ Dispersion aqueuse en milieu neutre ou basique d'un copolymère final présentant des groupements fonctionnels en surface, caractérisée en ce qu'elle comprend un agent tensioactif non ionique ou cationique.

11/ Dispersion selon la revendication 6, caractérisée en ce que la quantité d'agent tensioactif utilisée pour un litre de copolymère est représentée par QT définie par l'équation :

$$15 \quad QT = Tr. \frac{SL}{100.Ao}$$

dans laquelle :

- QT est le nombre de molécules de l'agent tensioactif
- Tr est le taux de recouvrement du copolymère par l'agent tensioactif
- 20 • Ao est l'aire spécifique occupée par une molécule d'agent tensioactif, en $\text{\AA}^2/\text{molécule}$
- SL est la surface développée par un litre de copolymère en m^2 , le taux de recouvrement Tr étant au moins de 15 %, de préférence compris entre 25 et 500 % et avantageusement entre 25 et 75 %.

25 12/ Dispersion selon les revendications 10 ou 11, caractérisée en ce qu'elle supporte un composé biologiquement actif couplé aux groupements fonctionnels du copolymère.

13/ Dispersion selon la revendication 12, caractérisée en ce que le composé biologiquement actif est un fragment d'anticorps.

30

35

112

FIG.1

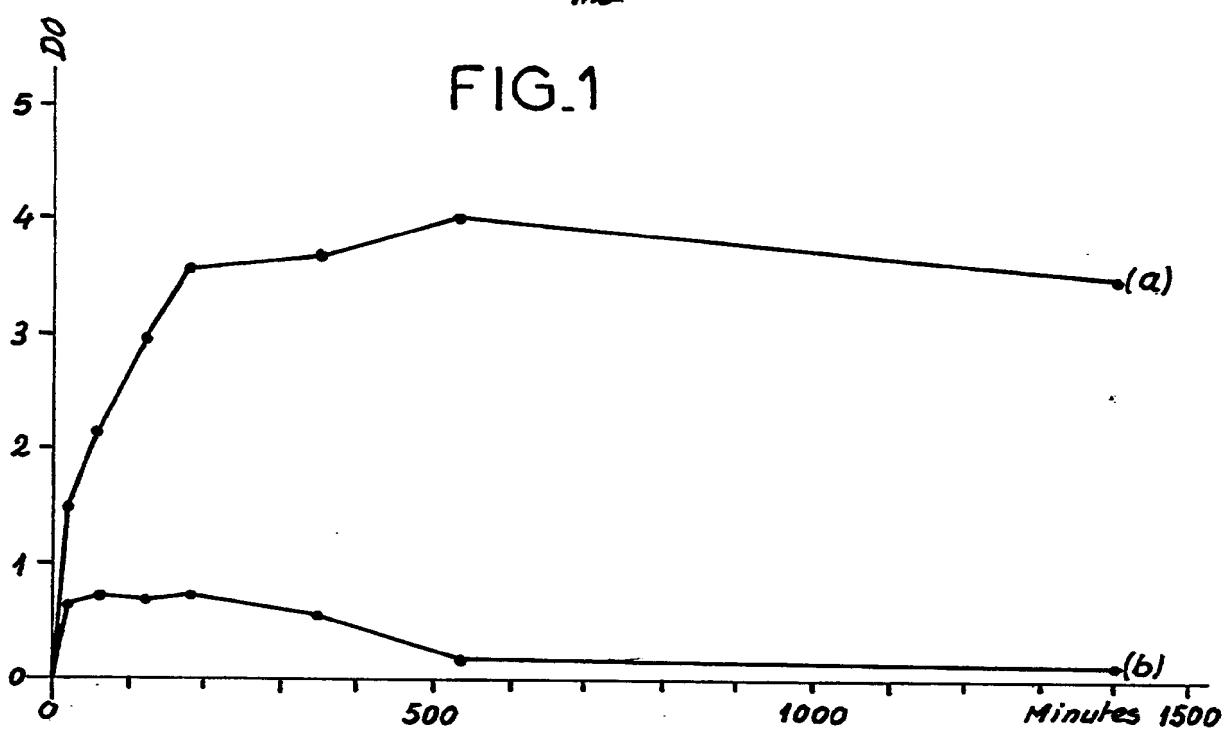
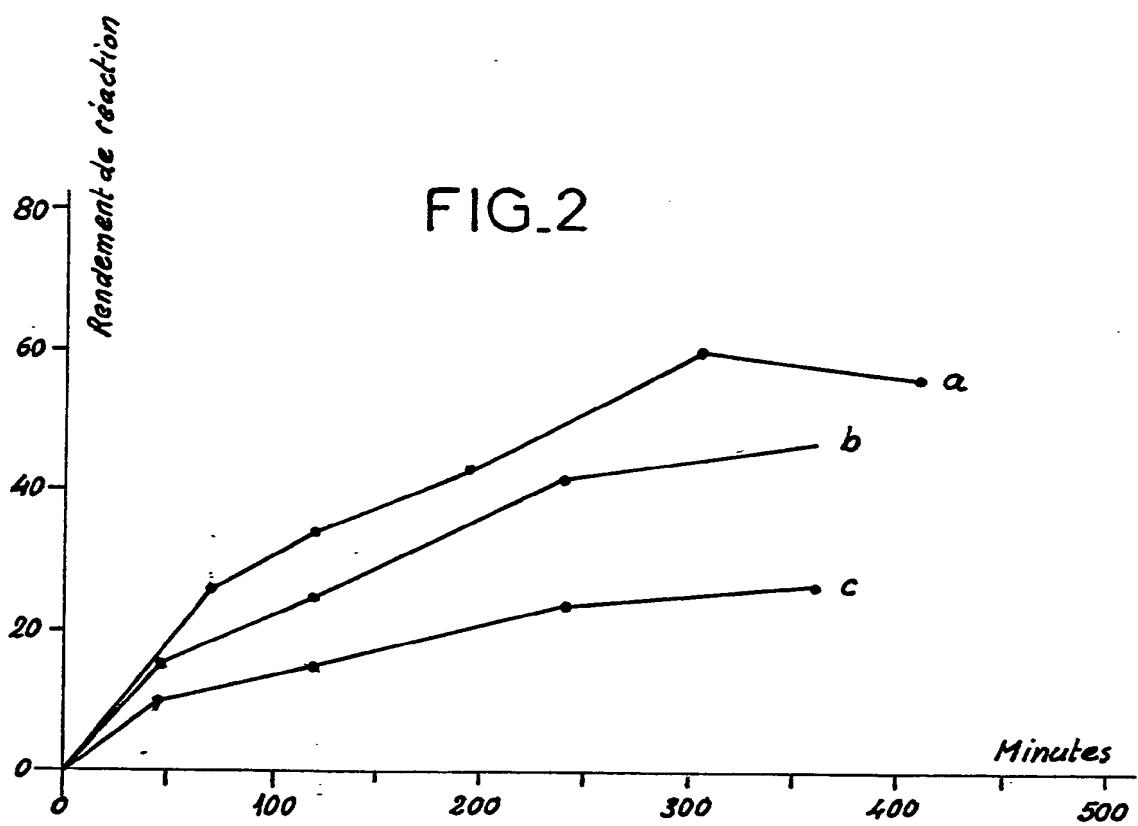
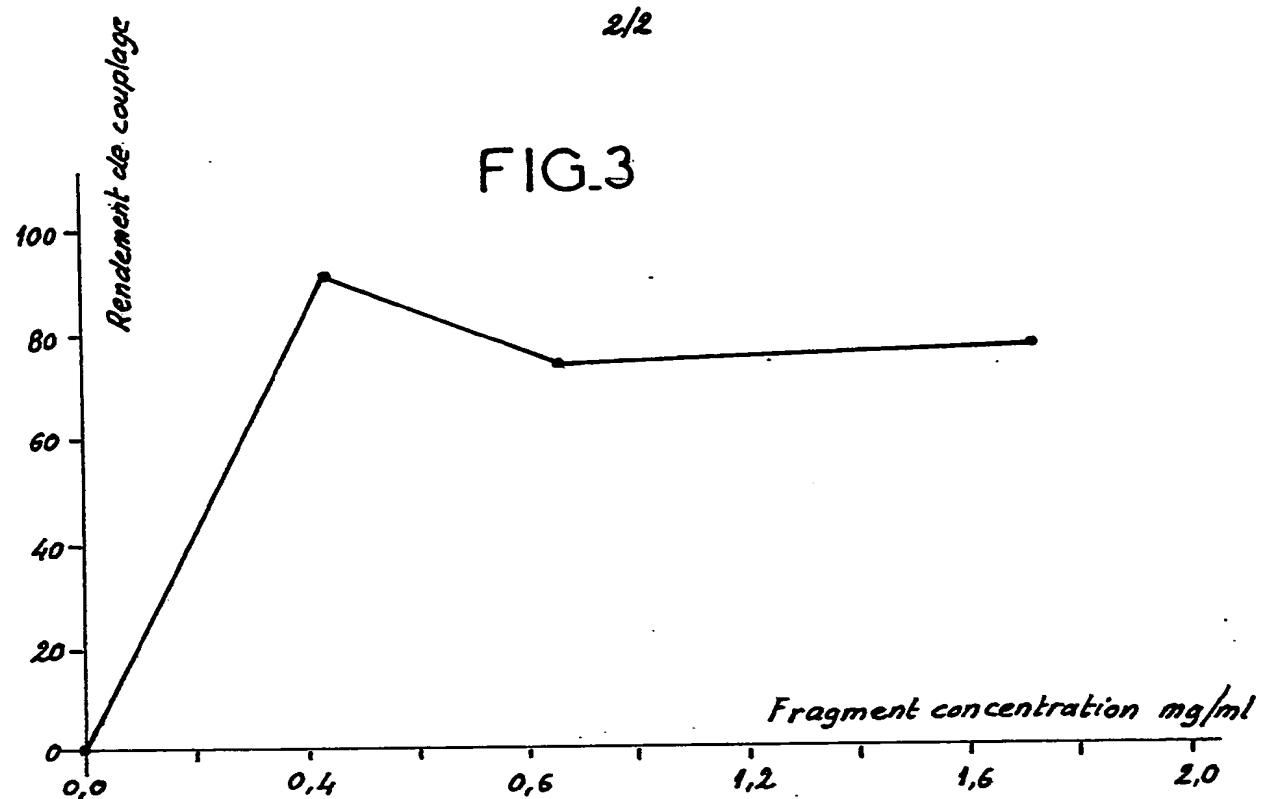


FIG.2



2/2

FIG.3



INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheFR 9106068
FA 458978

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
D, A	<p>DIE MAKROMOLEKULARE CHEMIE RAPID COMMUNICATIONS vol. 10, no. 8, Août 1989, BASEL, HEIDELBERG, NEW YORK pages 397 - 401; K. YAMAGUCHI, S. WATANABE, S. NAKAHAMA: 'SYNTHESIS OF POLYMER LATEX CONTAINING THIOL GROUPS ON THE SURFACE BY EMULSION POLYMERIZATION OF STYRENE IN PRESENCE OF A POLYMERIZABLE ISOTHIURONIUM SALT' * le document en entier *</p> <p>FR-A-2 139 468 (BEHRINGWERKE AG)</p> <p>* le document en entier *</p> <p>EP-A-0 314 488 (HOECHST CELANESE CORPORATION)</p> <p>* colonne 3, ligne 57 - colonne 4, ligne 39 *</p> <p>* colonne 5, ligne 9 - colonne 5, ligne 58 *</p> <p>WORLD PATENTS INDEX Section Ch, Week 7820, 8 Avril 1978 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class C, AN 78-35956A & JP-A-53 038 625 (MITSUBISHI CHEM IND KK) * abrégé *</p>	1, 2, 5, 6, 8, 10, 12
A		1, 2, 5, 6, 8, 10, 12
A		1, 2, 6, 8
A		1, 2, 6, 8
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
		C08F C07K
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
08 JANVIER 1992		KAUMANN E. K.-H.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
<p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons Z : membre de la même famille, document correspondant</p>		

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)